

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number :

2002-125693

(43) Date of publication of application : 08.05.2002

(51) Int.CI.

C12P 21/02  
C12N 1/20  
C12N 5/04  
C12N 5/06

(21) Application number : 2000-320106

(71) Applicant : TOYOB CO LTD

WAKENYAKU KK  
ENDO YAETA

(22) Date of filing : 19.10.2000

(72) Inventor : KUROITA TOSHIHIRO  
KAWAKAMI FUMIKIYO  
KAWAMURA YOSHIHISA  
NISHIKAWA SHIGEMICHI  
ENDO YAETA

## (54) CELL EXTRACT COMPOSITION FOR SYNTHESIZING CELL-FREE PROTEIN

### (57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a cell extract composition intended for synthesizing cell-free protein and having high preservation stability in a lyophilized condition, and to provide a cell extract composition intended for synthesizing cell-free protein and having high preservation stability in a frozen condition.

**SOLUTION:** This lyophilizable or lyophilized cell extract composition for synthesizing cell-free protein is characterized by containing inositol. The other objective freezable or frozen cell extract composition for synthesizing cell-free protein is characterized by containing a polyhydric alcohol.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-125693

(P2002-125693A)

(43)公開日 平成14年5月8日(2002.5.8)

(51)Int.Cl.

識別記号

F I

テ-73-ト(参考)

C 12 P 21/02

C 12 P 21/02

C 4 B 0 6 4

C 12 N 1/20

C 12 N 1/20

A 4 B 0 6 5

5/04

5/00

F

5/06

E

審査請求 未請求 請求項の数24 O.L. (全14頁)

(21)出願番号 特願2000-320106(P2000-320106)

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(22)出願日 平成12年10月19日(2000.10.19)

(71)出願人 591106680

和研薬株式会社

京都府京都市左京区一乗寺西水干町17番地

(71)出願人 594016182

遠藤 弥重太

愛媛県松山市久万ノ台478-17

(74)代理人 100080791

弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液組成物

(57)【要約】

【課題】 凍結乾燥状態での保存安定性に優れた無細胞タンパク質合成用の細胞抽出液組成物、および凍結状態での保存安定性に優れた無細胞タンパク質合成用の細胞抽出液組成物を提供する。

【解決手段】 イノシトールを含有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物、および多価アルコールを含有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 イノシトールを含有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【請求項2】 イノシトールの含有量が、組成物中のタンパク質1重量部に対して0.3~3重量部である請求項1記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【請求項3】 さらにトレハロース、マンニトールおよびスクロース-エピクロロヒドリン共重合体からなる群から選択される少なくとも一種の成分を含有する請求項1または2記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【請求項4】 潤解性物質の含有量が、組成物中のタンパク質1重量部に対して0.01重量部以下である請求項1~3のいずれかに記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【請求項5】 潤解性物質が、酢酸カリウムおよび/または酢酸マグネシウムである請求項4記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【請求項6】 細胞抽出液が、植物種子、大腸菌または哺乳類網状赤血球に由来する請求項1~5のいずれかに記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【請求項7】 細胞抽出液が、コムギ、オオムギ、イネ、コーンおよびホウレンソウからなる群から選択される植物種子に由来する請求項6記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【請求項8】 さらに無細胞タンパク質合成に関連する生理活性タンパク質を含有する請求項1~7のいずれかに記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【請求項9】 生理活性タンパク質が、クレアチン(ホスホ)キナーゼ、ビルビン酸キナーゼ、RNAポリメラーゼおよびシャベロンタンパク質からなる群から選択される少なくとも一種である請求項8記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【請求項10】 多価アルコールを含有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【請求項11】 多価アルコールの含有量が、組成物中のタンパク質1重量部に対して0.1~10重量部である請求項10記載の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【請求項12】 多価アルコールが、イノシトール、グルシトール、マンニトール、キシリトール、スクロース-エピクロロヒドリン共重合体、トレハロースおよびスクロースからなる群から選択される少なくとも一種である請求項10または11記載の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【請求項13】 細胞抽出液が、植物種子、大腸菌または哺乳類網状赤血球に由来する請求項10~12のいずれかに記載の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【請求項14】 細胞抽出液が、コムギ、オオムギ、イネ、コーンおよびホウレンソウからなる群から選択される植物種子に由来する請求項13記載の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【請求項15】 さらに無細胞タンパク質合成に関連する生理活性タンパク質を含有する請求項10~14のいずれかに記載の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【請求項16】 生理活性タンパク質が、クレアチン(ホスホ)キナーゼ、ビルビン酸キナーゼ、RNAポリメラーゼおよびシャベロンタンパク質からなる群から選択される少なくとも一種である請求項15記載の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【請求項17】 請求項1~16のいずれかに記載の組成物と、無細胞タンパク質合成に関連する要素を含む無細胞タンパク質合成用キット。

【請求項18】 請求項1~16のいずれかに記載の組成物または請求項17記載のキットを用いることを特徴とする無細胞タンパク質合成方法。

【請求項19】 アミノ酸およびエネルギー源の連続供給系を用いて行うことの特徴とする請求項18記載の方法。

【請求項20】 透析法を用いることを特徴とする請求項19記載の方法。

【請求項21】 イノシトールを含有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の安定化方法。

【請求項22】 イノシトールの含有量が、細胞抽出物中のタンパク質1重量部に対して0.3~3重量部である請求項21記載の安定化方法。

【請求項23】 多価アルコールを含有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の安定化方法。

【請求項24】 多価アルコールの含有量が、細胞抽出物中のタンパク質1重量部に対して0.1~3重量部である請求項23記載の安定化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、安定化された無細胞タンパク質合成用組成物に關し、詳しくはイノシトールを安定化剤として含有する無細胞タンパク質合成用の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物、および多価アルコールを安定化剤として含有する無細胞タンパク質合成用の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 無細胞タンパク質合成法は、生体のタン

タンパク質合成に関わる成分を生体外へ取り出し、目的タンパク質をコードするメッセンジャーRNA(mRNA)等の核酸と、ATP、GTP等のエネルギー源、および材料となるアミノ酸を用いて、細胞を利用することなく半人工的にタンパク質を合成する手段であり、これまで用いられてきたタンパク質合成の手段として組換え微生物や培養細胞等を用いる方法と比べ、(1)生体に負に作用するようなタンパク質(翻訳系に影響を及ぼすものは除く)の合成が比較的容易である、(2)簡便に条件を決定することができる(微生物等を用いる場合、最低一ヶ月程度を要するのが普通である)、(3)非天然型アミノ酸を用いることができる、等の利点を有する。これらのことから、今後、無細胞タンパク質合成法は、多種類のタンパク質を短時間で合成する必要がある場合や、組み換え生物による生産が困難であるタンパク質の合成等の幅広い用途に使用されることが期待されている。

【0003】無細胞タンパク質合成法に使用される生体材料としては、大腸菌、哺乳類網状赤血球、コムギ胚芽が用いられることが多く、また、現在までに様々な細胞抽出液の調製方法や利用方法が構築されてきた。しかしながら、これらの細胞抽出液のタンパク質合成活性は、-70°C以上の条件で保存した場合は活性が失われる。従って、現時点では抽出液を-70°C以下で凍結して保存し、輸送することが一般的に行われている。また、タンパク質合成にはリボソームを始め約50種類を超える様々な酵素や因子が必要であり、それらを安定に供給するためにはそれらの混合物を一括して安定化する技術を確立する必要がある。

【0004】そこで近年、細胞抽出液を凍結乾燥して冷蔵保存する技術の開発が進められてきた。一般的に凍結乾燥を行う場合、安定化を促すために添加剤を加えることが広く行われている。現在までにトレハロースが凍結乾燥時の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を安定化することが報告されている(WO9802532)。ところで、添加剤を選択するときに問題となるのは、長期の保存安定性である。長期の保存安定性を確認するには一般的に過酷条件(25°C以上の保存等)での保存安定性テストが行われるのが普通であり、このテストは実際の長期保存安定性をよく反映していると考えられている。しかしながら、本発明者らの検討においては、トレハロースを添加したものにおいても37°Cにおける活性の低下は避けられない、すなわち、長期保存には不安が残るものであることが明らかになった。

【0005】また一方で、無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の凍結状態での保存安定性、特に一般的な保存・運搬に使用される-30~-15°C付近での安定化については、今までほとんど検討されていないのが現状であった。以上のことから、無細胞タンパク質用細胞抽出液の保存安定化にさらに有効な添加剤が求められていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、凍結乾燥状態での保存安定性に優れた無細胞タンパク質合成用の細胞抽出液組成物、および凍結状態での保存安定性に優れた無細胞タンパク質合成用の細胞抽出液組成物を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、様々な添加剤のスクリーニングを行った結果、イノシトールが無細胞タンパク質合成用の細胞抽出液組成物の凍結乾燥状態での保存安定性を向上させること、および多価アルコールが無細胞タンパク質合成用の細胞抽出液組成物の凍結状態での保存安定性を向上させることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の通りである。

【1】イノシトールを含有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【2】イノシトールの含有量が、組成物中のタンパク質1重量部に対して0.3~3重量部である【1】記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【3】さらにトレハロース、マンニトールおよびスクロース-エピクロロヒドリン共重合体からなる群から選択される少なくとも一種の成分を含有する【1】または【2】記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【4】潮解性物質の含有量が、組成物中のタンパク質1重量部に対して0.01重量部以下である【1】~【3】のいずれかに記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【5】潮解性物質が、酢酸カリウムおよび/または酢酸マグネシウムである【4】記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【6】細胞抽出液が、植物種子、大腸菌または哺乳類網状赤血球に由来する【1】~【5】のいずれかに記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【7】細胞抽出液が、コムギ、オオムギ、イネ、コーンおよびホウレンソウからなる群から選択される植物種子に由来する【6】記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【8】さらに無細胞タンパク質合成に関連する生理活性タンパク質を含有する【1】~【7】のいずれかに記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【9】生理活性タンパク質が、クレアチン(ホスホ)キナーゼ、ビルビン酸キナーゼ、RNAポリメラーゼおよびシャペロンタンパク質からなる群から選択される少なくとも一種である【8】記載の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物。

【10】多価アルコールを含有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【11】多価アルコールの含有量が、組成物中のタンパク質1重量部に対して0.1~10重量部である【10】記載の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【12】多価アルコールが、イノシトール、グルシトール、マンニトール、キシリトール、スクロース-エピクロロヒドリン共重合体、トレハロースおよびスクロースからなる群から選択される少なくとも一種である【10】または【11】記載の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【13】細胞抽出液が、植物種子、大腸菌または哺乳類網状赤血球に由来する【10】~【12】のいずれかに記載の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【14】細胞抽出液が、コムギ、オオムギ、イネ、コーンおよびホウレンソウからなる群から選択される植物種子に由来する【13】記載の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【15】さらに無細胞タンパク質合成に関連する生理活性タンパク質を含有する【10】~【14】のいずれかに記載の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【16】生理活性タンパク質が、クレアチン(ホスホ)キナーゼ、ビルビン酸キナーゼ、RNAポリメラーゼおよびシャベロンタンパク質からなる群から選択される少なくとも一種である【15】記載の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物。

【17】【1】~【16】のいずれかに記載の組成物と、無細胞タンパク質合成に関連する要素を含む無細胞タンパク質合成用キット。

【18】【1】~【16】のいずれかに記載の組成物または【17】記載のキットを用いることを特徴とする無細胞タンパク質合成方法。

【19】アミノ酸およびエネルギー源の連続供給系を用いて行うことの特徴とする【18】記載の方法。

【20】透析法を用いることを特徴とする【19】記載の方法。

【21】イノシトールを含有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の安定化方法。

【22】イノシトールの含有量が、細胞抽出物中のタンパク質1重量部に対して0.3~3重量部である【21】記載の安定化方法。

【23】多価アルコールを含有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の安定化方法。

【24】多価アルコールの含有量が、細胞抽出物中のタンパク質1重量部に対して0.1~3重量部である【23】記載の安定化方法。

【0008】

【発明の実施の形態】【無細胞タンパク質合成用の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物】本発明の無細胞タンパク質合成用の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物は、凍結乾燥され得る(すなわち、凍結乾燥され得る性質を有する)組成物か、または凍結乾燥された状態の組成物である。当該組成物は、イノシトールを含有することを特徴とし、当該イノシトールの作用により凍結乾燥状態で優れた保存安定性を示す組成物である。

【0009】上記組成物における無細胞タンパク質合成用の細胞抽出液とは、植物細胞、動物細胞、真菌細胞、細菌細胞等の各種の細胞や組織等から抽出される生体のタンパク質合成に関連する成分であって、無細胞タンパク質合成に適用可能な状態(すなわち、無細胞条件下でタンパク質合成能力を有する状態)で存在する成分(細胞抽出物)を含有する溶液を意味する。当該細胞抽出液は、通常、上記のような細胞を破碎した後、タンパク質成分およびリボソームを可溶化するための数種類の塩を含有する緩衝液を加えホモジナイズし、遠心分離にて不溶成分を沈殿させ、ゲル濾過等により細胞由来の低分子成分を除去するという方法によって得られる。また、その構成は、生体材料、調製方法等によって変動するが、例えば、後記コムギ胚芽細胞抽出液の場合、通常、タンパク質20~60 mg/ml、トランスファーRNA(tRNA) 0.1~0.5 mg/ml、およびリボソームを主成分とする。

【0010】上記無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の由来としては、特に限定されないが、入手が容易であること、簡便な調製方法が確立されていること、タンパク質合成能力が高いこと等の点から、好ましくは植物種子、大腸菌および哺乳動物網状赤血球由来のものが挙げられる。当該植物種子における植物としては、好ましくはコムギ、オオムギ、イネ、コーン、ホウレンソウが挙げられ、特に好ましくはコムギが挙げられる。当該大腸菌としては、好ましくはプラスミドを持たない方が好ましく、一般にK-1株由来の大腸菌が用いられることが多い。また、当該哺乳動物網状赤血球における哺乳動物としては、好ましくはウサギ、マウス、ラット、モルモットが挙げられる。なかでも植物種子、好ましくはコムギ、オオムギ、イネ、コーンおよびホウレンソウの種子、特に好ましくはコムギ種子由来のものが挙げられ、なかでも胚乳を含まない胚芽、特にコムギ胚芽由来のものが好ましい。

【0011】当該胚乳を含まない胚芽由来の細胞抽出液(胚芽抽出液)、特にコムギ胚芽抽出液は、胚乳に局在するリボソーム特異的グリコシダーゼ(トリチン)等のタンパク質合成阻害剤成分をほとんど含有していないため、これを無細胞タンパク質合成に適用した場合、高効率でタンパク質を合成することができる。当該胚芽抽出液は、好ましくはK. Madinらの方法(K. Madin et al.

(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(2), 559-564) に従って胚芽を水溶液中で超音波洗浄して胚乳成分を洗浄することにより胚芽を純化し、次いで純化した胚芽を常法（例えば、A. H. Erickson et al. (1996) Method. in Enzymol., 96, 38-50）に従って処理することにより得られる。

【0012】上記組成物は、細胞抽出液由来（および必要に応じて別途添加される）タンパク質を含有する。その含有量は、特に限定されないが、凍結乾燥状態での保存安定性、使い易さ等の点から、凍結乾燥前の組成物において、当該組成物全体の好ましくは1~10重量%、より好ましくは2.5~5重量%であり、また、凍結乾燥後の凍結乾燥組成物において、当該凍結乾燥組成物全体の好ましくは10~90重量%、より好ましくは25~70重量%である。また、必要に応じて、ゲル濾過、透析等の常法により、凍結乾燥前の組成物において、タンパク質含有量を上記範囲内になるようにしてよい。なお、ここでいうタンパク質含有量は、吸光度(260, 280, 320 nm)を測定することにより算出されるものである（後記実施例参照；以下のタンパク質の含有量も同様の方法による）。

【0013】上記組成物におけるイノシトールは、凍結乾燥状態において細胞抽出液に含有される成分の安定化剤として作用する。当該イノシトールは、イノシット、ヘキサヒドロキシシクロヘキサン、シクロヘキサンヘキソール、シクロヘキシトール、肉糖等とも呼ばれる分子量180.16のシクロヘキサン6価アルコールの総称であり、9種類の立体異性体 (myo-イノシトール、D(+)-イノシトール、L(-)-イノシトール、muco-イノシトール、scy11-イノシトール、cis-イノシトール、epi-イノシトール、allo-イノシトール、neo-イノシトール) が存在する。天然にはmyo-イノシトール、D(+)-イノシトール、L(-)-イノシトール、muco-イノシトール、scy11-イノシトールが確認されている。本発明においてはいずれの立体異性体も使用することができるが、入手が容易であることから、myo-イノシトールを使用することが好ましい。また、当該イノシトールは2種以上の立体異性体を併用することができる。

【0014】上記組成物中のイノシトールの含有量は、当該組成物中に含有されるタンパク質1重量部に対して好ましくは0.3~3重量部、より好ましくは0.5~2重量部である。0.3重量部より少ないと凍結乾燥状態において十分な保存安定性が得られない可能性や、吸湿により活性が低下する恐れがあり、一方、3重量部を超えるとタンパク質合成反応を阻害してしまう恐れがある。また、当該イノシトールは、好ましくは細胞抽出液に適量となるようにイノシトール溶液（もしくは粉末）を添加するか、ゲル濾過、透析等でイノシトールを含有する溶液に置換することで当該組成物中に含有させねばよい。

【0015】上記組成物は、好ましくはイノシトールと共に、トレハロース、マンニトールおよびスクロースー

エピクロロヒドリン共重合体（例えば、フィコール（商品名）；アマシャムファルマシアバイオテク株式会社）からなる群から選択される少なくとも一種の成分を含有する。これらをイノシトールと併用することで無細胞タンパク質合成活性を低下させることなく、さらに凍結乾燥状態での保存安定性を向上させることができる。当該組成物におけるこれらの含有量は、イノシトールの場合と同様の理由から、当該組成物中に含有されるタンパク質1重量部に対して、好ましくは0.1~3重量部、より好ましくは0.5~2重量部である。

【0016】上記組成物において、潮解性を示す物質（潮解性物質）は、凍結乾燥状態での保存安定性を低下させるので、その含有量は、当該組成物中に含有されるタンパク質1重量部に対して、0.01重量部以下が好ましく、特に0.005重量部以下が好ましい。当該潮解性物質としては、酢酸カリウムおよび/または酢酸マグネシウムが挙げられる。また、細胞抽出液は、通常、細胞から調製する際に酢酸カリウムおよび/または酢酸マグネシウムを含有する溶液（緩衝液）を使用することから、酢酸カリウムを100 mM程度、酢酸マグネシウムを5 mM程度含有する。従って、凍結乾燥前に細胞抽出液を、ゲル濾過、透析等することにより、凍結乾燥組成物において該潮解性物質の含有量が上記範囲内になるようにすることが好ましい。

【0017】上記組成物は、好ましくは無細胞タンパク質合成に関連する生理活性タンパク質を含有する。当該無細胞タンパク質合成に関連する生理活性タンパク質とは、基質（特にATP）再生に関与する酵素、DNAからタンパク質合成の雰囲となるRNAを合成する反応に関与する酵素およびタンパク質の三次元構造を形成する働きを持つシャベロンタンパク質類を意味する。当該基質（特にATP）再生に関与する酵素としては、クレアチニン（ホスホ）キナーゼ、ビルビン酸キナーゼ等が挙げられる。当該RNAを合成する反応に関与する酵素としては、各種のRNAポリメラーゼ（T7、T3、およびSP6 RNA polymerase等）が挙げられる。また、当該シャベロンタンパク質類としては、各種のシャベロンタンパク質（DnaJ、DnaK、GroE、GroEL、GroESおよびHSP70等）が挙げられる。また、当該生理活性タンパク質は2種以上併用してもよい。

【0018】上記組成物における上記生理活性タンパク質の含有量は、特に限定されないが、凍結乾燥状態での保存安定性、機能性の点から、当該組成物に含有されるタンパク質全体の1~10重量%、より好ましくは2~5重量%である。当該生理活性タンパク質は、細胞抽出液中に含まれている場合もあるが、通常、その量は、上記無細胞タンパク質合成を十分に進行させるだけの量ではない。従って、通常、無細胞タンパク質合成に際して別途添加する必要があるが、本発明においては、安定化剤として作用するイノシトールが別途添加した生理活性タン

バク質も凍結乾燥状態において安定化することができるところから、このように予め当該組成物中に含有させておくことができる。その結果、無細胞タンパク質合成に際して当該生理活性タンパク質を別途添加する手間を省くことができるばかりでなく、試薬製造にかかるコストを減少させることができるので好ましい。

【0019】上記組成物は、必要に応じて、無細胞タンパク質合成に関連する非タンパク質性成分を補強することができる。当該非タンパク質性成分とは、元々無細胞タンパク質合成用細胞抽出液中に含まれている成分であるが、別途添加することでタンパク質合成能を向上させることができる成分である。当該成分としては、tRNAが挙げられる。当該成分の使用量としては、想定される無細胞タンパク質の合成条件、無細胞タンパク質合成用細胞抽出液のタンパク質合成活性、合成するタンパク質の種類等によって適宜設定することができるが、tRNAの場合、通常、当該組成物中のタンパク質1重量部に対して、0.01~0.05重量部、好ましくは0.02~0.04重量部である。

【0020】上記組成物の凍結乾燥方法および凍結乾燥に用いる機器としては特に限定されないが、凍結乾燥時においては、容器を金属トレイ等熱伝導度のよい容器に密着させておくことが好ましい。特にマイクロチューブ内で行う場合、マイクロチューブの形に成型されたアルミプロック等を使用する方が好ましい。実際の凍結乾燥時において、好ましくは、サンプルを-30°C以下で30分以上凍結させ、真空ポンプを用いて減圧した後、金属板(トレイ)の温度を徐々に上昇させる。この際、必要に応じてヒーターを使用してもよい。凍結乾燥の終了の確認は、金属板の温度と品温が同一になったことを目安とする。また、最後に窒素置換を行うことが好ましい。なお、通常、各成分の凍結乾燥による損失は非常に少なく、無視することができる。従って、凍結乾燥前の各成分の重量比(濃度比)は、通常、凍結乾燥組成物における重量比と一致する。

【0021】上記組成物は、凍結乾燥状態において、従来の無細胞タンパク質合成に用いられる凍結乾燥組成物に比べて保存安定性に優れている。例えば、2~10°Cに保存した場合、通常10~20日間程度は安定であり、-35°C~-15°Cに保存した場合、通常120~180日間程度は安定である(すなわち、当該保存条件において、無細胞タンパク質合成活性が少なくとも80%以上保持される)。

【0022】[無細胞タンパク質合成用の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物] 本発明の無細胞タンパク質合成用の凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物は、凍結され得る(すなわち、凍結され得る性質を有する)組成物か、または凍結された状態の組成物である。当該組成物は、多価アルコールを含有することを特徴とし、多価アルコールの作用により凍結状態において優れた保存安定性を示す組成物である。

【0023】上記組成物における無細胞タンパク質合成用の細胞抽出液としては、上記凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された組成物におけるものが挙げられる。

【0024】上記組成物におけるタンパク質の含有量は、凍結状態での保存安定性、使い易さ等の点から、当該組成物全体の1~10重量%であり、好ましくは2.5~5重量%である。

【0025】上記組成物における多価アルコールは、炭化水素の複数個の水素を水酸基で置換したものであれば特に限定されず、各種の天然または人工的に合成された糖類、糖アルコール、ポリエチレングリコール類、グリセロール等が挙げられる。好ましくは、保存安定性および機能性の点から、5炭糖類、6炭糖類およびそれらの誘導体(重合体等)が挙げられる。なかでも凍結状態の細胞抽出液組成物を保存安定化する能力が優れていることから、好ましくはイノシトール、グルシトール、マンニトール、キシリトール、スクロース-エピクロロヒドリン共重合体(例えば、フィコール(商品名)；アマシャムファルマシアバイオテク株式会社)、トレハロース、スクロースが挙げられる。より好ましくは、凍結状態の細胞抽出液組成物を保存安定化する能力に優れているばかりでなく、無細胞タンパク質合成活性に悪影響を及ぼすことがないことから、イノシトール、グルシトール、キシリトール、スクロース-エピクロロヒドリン共重合体が挙げられる。また、当該多価アルコールは2種以上併用してもよい。

【0026】上記組成物中の当該多価アルコールの含有量は、特に限定されないが、凍結状態での保存安定性、無細胞タンパク質合成反応系への影響および使い勝手等の点から、当該組成物中に含有されるタンパク質1重量部に対して、好ましくは0.1~10重量部、より好ましくは0.1~3重量部、特に好ましくは0.5~2重量部である。

【0027】上記組成物は、上記凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された組成物と同様に、無細胞タンパク質合成に関連する生理活性タンパク質を含有することが好ましい。当該生理活性タンパク質としては、上記凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された組成物におけるものが挙げられる。当該生理活性タンパク質の含有量は、凍結状態での保存安定性、機能性の点から、好ましくは当該組成物に含有されるタンパク質全体の1~10重量%、より好ましくは2~5重量%である。

【0028】また、上記組成物は、必要に応じて、上記凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された組成物と同様に、無細胞タンパク質合成に関連する非タンパク質性成分を補強することができる。このような成分としては、上記凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された組成物におけるものが挙げられる。また、上記組成物中の当該成分の含有量は、想定される無細胞タンパク質の合成条件、合成するタンパク質の種類等に応じて適宜設定すればよいが、通常、当該組成物中のタンパク質1重量部に対し

て、0.01～0.05重量部、好ましくは0.02～0.04重量部である。

【0029】上記組成物の凍結方法としては、特に限定されず、常法に従って行えばよいが、可能な限り迅速に目的の温度に到達するように行うことが好ましい。

【0030】上記組成物は、凍結状態において、従来の凍結組成物よりも保存安定性に優れている。例えば、-35～-15°Cに保存した場合、通常4～100日間程度は安定であり、-70～-35°Cに保存した場合、通常100～300日間程度は安定である（すなわち、当該保存条件において、無細胞タンパク質合成活性が少なくとも80%以上保持される）。

【0031】〔無細胞タンパク質合成用キット〕本発明の組成物は、無細胞タンパク質合成に関連する要素と共に無細胞タンパク質合成用キットを構成することができる。当該無細胞タンパク質合成に関連する要素とは、タンパク質合成を安定に持続させるものや、合成するタンパク質の機能の安定化または向上に関わる要素を意味し、例えば、無細胞タンパク質合成に関連する生理活性タンパク質〔ATP再生に関わる酵素（クレアチニン（ホスホ）キナーゼやビルビン酸キナーゼ等）、各種のRNAポリメラーゼ（T7、T3、およびSP6 RNA polymerase等）、シャベロンタンパク質（DnaJ、DnaK、GroE、GroEL、GroESおよびHSP70等）〕、アミノ酸、エネルギー源（ATP、GTP、クレアチニン酸等）、RNA（mRNA、tRNA等）、ブロテアーゼ阻害剤、（リボ）ヌクレアーゼ阻害剤等が挙げられる。当該要素は2種以上併用することができる。

【0032】また、上記無細胞タンパク質合成用キットは、逆転写酵素、耐熱性DNAポリメラーゼ、プライマー類、各種デオキシリボヌクレオシド三リン酸（dNTPs）、各種緩衝液（またはこれらを含有するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）試薬）と共にリボソームディスプレイ用キットを構成することができる。当該リボソームディスプレイ用キットとは、相互作用、例えばタンパク質-タンパク質相互作用を利用して、目的のmRNA-リボソームタンパク質合成中間体を分離し、そのmRNAを逆転写し、PCR法を用いて増幅することにより、その物質に相互作用するタンパク質の遺伝子を単離する方法である。

【0033】〔無細胞タンパク質合成方法〕本発明の組成物（これらを含む無細胞タンパク質合成用キットも含む）を使用して、無細胞タンパク質合成を行うことができる。例えば、これらの組成物を、目的とするタンパク質をコードするmRNA、目的タンパク質の構成材料となるアミノ酸およびエネルギー源（ATP、GTP等）を含有する反応系に添加し、当該反応液を通常20～40°C、好ましくは23～30°Cに加温することで目的タンパク質を合成することができる。

【0034】また、上記反応系において、アミノ酸およびエネルギー源の連続供給系を適用することで連続的にタンパク質を合成することもできる。当該連続的無細胞

タンパク質合成方法としては、アミノ酸およびエネルギー源の連続供給系として透析を利用する方法、すなわち、上記反応系をアミノ酸およびエネルギー源（ATP、GTP等）を含有する外液に対して透析する方法（透析法）が挙げられる。当該透析法としては、好ましくは遠藤等の論文（Y. Endo et al., (1992) J. Biotech., 25, 221-230およびK. Madin et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(2), 559-564）に記載される方法が挙げられる。例えば、上記反応系を分画分子量3,500～100,000、好ましくは10,000～50,000の透析膜を有する透析装置に入れ、反応溶液の5～10倍容量の透析外液（アミノ酸、エネルギー源（ATP、GTP等）を含有する）に対して透析を行うようにすればよい。透析は、通常20～40°C、好ましくは23～30°Cにて攪拌しつつ行い、定期的（通常24時間毎）新しい外液と交換するようとする。また、新たな目的タンパク質のmRNAを定期的（通常24時間毎）に反応溶液に補給してもよい。

【0035】〔無細胞タンパク質合成用の細胞抽出物の安定化方法〕本発明の無細胞タンパク質合成用の細胞抽出物の安定化方法は、イノシトールを含有することを特徴とし、イノシトールの作用により凍結乾燥状態において無細胞タンパク質合成用の細胞抽出物を安定化する方法である。当該方法におけるイノシトールおよび無細胞タンパク質合成用の細胞抽出物は、上記凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物におけるものが挙げられ、同様に、イノシトールの使用量は、細胞抽出物中のタンパク質1重量部に対して好ましくは0.3～3重量部、より好ましくは0.5～2重量部である。また、イノシトールは、上記組成物の場合と同様にして、無細胞タンパク質合成用の細胞抽出物に含有させればよい。

【0036】上記方法は、上記凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された細胞抽出液組成物における場合と同様に、凍結乾燥状態における保存安定性を向上させるために、イノシトールに加えて、さらにトレハロース、マンニトールおよびスクロース-エビクロロヒドリン共重合体からなる群から選択される少なくとも一種の成分を含有することができる。また、上記方法における細胞抽出物は、上記潮解性物質の含有量を上記範囲内にしたものでもよく、また、上記無細胞タンパク質合成に関連する生理活性タンパク質や、上記無細胞タンパク質合成に関連する非タンパク質性成分を含有していてもよい。

【0037】また、本発明の別の無細胞タンパク質合成用の細胞抽出物の安定化方法は、多価アルコールを含有することを特徴とし、多価アルコールの作用により凍結状態において無細胞タンパク質合成用の細胞抽出物を安定化する方法である。当該方法における多価アルコールおよび無細胞タンパク質合成用の細胞抽出物は、上記凍結され得るまたは凍結された細胞抽出液組成物におけるものが挙げられ、同様に、多価アルコールの使用量は、細胞抽出物中のタンパク質1重量部に対して好ましくは

0.1~10重量部、より好ましくは0.1~3重量部、特に好ましくは0.5~2重量部である。また、当該多価アルコールは2種以上を併用してもよい。さらに、上記方法における細胞抽出物は、上記無細胞タンパク質合成に関連する生理活性タンパク質や、上記無細胞タンパク質合成に関連する非タンパク質性成分を含有していてもよい。

【0038】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0039】実施例に使用したmyo-イノシトール、トレハロース、マンニトール、グルシトール、キシリトール、スクロースは、ナカリテスク株式会社より購入し、フィコール400(商品名)はアマシャムファルマシアバイオテク株式会社より購入した。また、実施例において使用した各測定方法を以下に示す。

【0040】[1] バッチ式無細胞タンパク質合成活性測定法

バッチ法によるタンパク質合成活性の測定は、以下のような反応条件にて反応を行うことにより測定した。まず、サンプルである後記凍結乾燥組成物に対して全量で25  $\mu$ lになるように滅菌蒸留水を添加することにより試験液を調製した。また、後記凍結組成物については解凍後の溶液を試験液とした。次いで、当該試験液を全容量の25%(v/v)とし、1000 units/ml リボヌクレアーゼ阻害剤(RNasin; 東洋精機株式会社製)、30 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、95 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、2.85 mM ジチオトレイトール、0.5 mg/ml クレアチニン(ホスホ)キナーゼ(Roche製)、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mM クレアチニン酸、0.38 mM スペルミジン、20種類のL-アミノ酸(各0.3 mM)、80  $\mu$ g/ml CAP付きGreen fluorescent protein(GFP)mRNA(Y. Endo et al. (1992) J. Biotech., 25, 221-230の方法に従って調製)、50 mCiの[U-14C]ロイシン(166 mCi/mmol;アマシャムファルマシアバイオテク株式会社製)を含む溶液(以下、反応溶液Aと称する)を調製した。反応は26°Cにて行い、一定時間後その5  $\mu$ lを1 cm  $\times$  0.5 cm角の濾紙にスポットした。[U-14C]ロイシンの取り込みの測定は、遠藤らの方法(Y. Endo et al. (1992) J. Biotech., 25, 221-230)に従って行った。すなわち、濾紙を冷10%(w/v)トリクロロ酢酸溶液中で30分間タンパク質を固定した後、5%(w/v)トリクロロ酢酸中で10分間煮沸、同液で2回リーンスした。更に、ジエチルエーテル/エタノール(1:1)、ジエチルエーテルに5分づつ処理し、3 mlのクリアゾルI(商品名;ナカリテスク株式会社製)を加えて液体シンチレーションカウンター(パッカード社製)にて放射活性を測定した。活性は、コントロールとして同一ロットのコムギ胚芽抽出液を液体窒素中でサンプルと同一時間保存したもの用い、その活性を100とした相対活性で表した。また、

それぞれの添加剤のコントロールとしては、同一濃度となるように各添加剤を添加し、凍結乾燥または凍結をせずに液体窒素中でサンプルと同一時間保存したもの用いた。

【0041】[2] 細胞抽出液および各組成物中のタンパク質含有量の測定

細胞抽出液および各組成物(凍結乾燥(凍結)前組成物および凍結乾燥(凍結)後組成物)中のタンパク質含有量は、タンパク質溶液の吸光度(260, 280, 320 nm)を測定することにより算出した。具体的には、必要に応じて滅菌蒸留水に溶解するか、または滅菌蒸留水で希釈(例えば、細胞抽出液の場合、400倍に希釈)することにより調製したタンパク質溶液を、滅菌蒸留水をブランクとしてBECKMAN社製フォトメーターDU640型(NUCLEIC ACID測定用アプリケーション)を用いて測定した。なお、この装置の測定値の算出は、Warburg-Christian法に準じている。

【0042】製造例1 コムギ胚芽抽出液の調製

(1) コムギ胚芽の単離

ミル、浮選、篩を用いる種子からの無傷(発芽能を有する)の単離方法はJohnston等の方法(F. B. Johnston et al. (1957) Nature, 179, 160-161)を改良して用いた。北海道産のチホクコムギ種子(未消毒)を1分間に100 gの割合でミル(Fritsch社製Rotor Speed Mill pulverisette 14型)に投入し、回転数8000 r.p.m.で種子を温和に破碎した。これを再度6000 r.p.m.で破碎した後、篩で粗胚芽画分(メッシュサイズ0.71 mm-1.00 mm)を得た後、四塩化炭素とシクロヘキサン混液(四塩化炭素:シクロヘキサン=2.5:1)を用いた浮選によって、発芽能を有する胚芽を浮上画分から回収し、室温乾燥によって有機溶媒を除去した。この胚芽画分に混在する種皮等の不純物をポリエチレン板等の静電気帶電体を用いて吸着除去した後、篩を用いて0.71 mm-0.85 mmの画分を分離した。胚乳成分を除去するために、K. Madinらの方法(K. Madin et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 559-564)に従って非イオン性界面活性剤であるNP40(ノニデットP40)の0.5%(w/v)溶液に懸濁し、超音波洗浄機を用いて、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄を繰り返し、最後に蒸留水により超音波洗浄を行い、コムギ胚芽を純化した。

【0043】(2) コムギ胚芽抽出液の調製

コムギ胚芽抽出液の調製とタンパク質合成溶液の調製は、常法(A. H. Erickson et al. (1996) Meth. in Enzymol., 96, 38-50)に準じて行った。また、以下の操作は4°Cにて行った。まず、洗浄したコムギ胚芽を乳鉢中で液体窒素を添加して凍結させ、乳棒を用いて完全に粉碎し、1 gあたり1 mlのPatterson等の方法を一部改変した抽出液(80 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 200 mM 酢酸カリウム、2 mM 酢酸マグネシウム、4 mM 塩化カルシウム、8 mM ジチオトレイトール)を加えて、泡立たな

いように注意しながら攪拌した。次に30k×g、15分間の遠心分離を行い、予め溶液(40 mM HEPES-KOH(pH 7.8)、0.6 mM L型アミノ酸(20種類)、100 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、4 mM ジチオトレイトル)で平衡化したセファデックスG-25カラム(Coarse)でゲル濾過によりバッファー交換を行った。最後に試料濃度を、200(A 260 nm)(Warburg-Christian法:5.00重量%)となるように調整し、小分けして液体窒素中で凍結保存した。

【0044】[凍結乾燥された細胞抽出液(コムギ胚芽抽出液)組成物の保存安定性に及ぼす各添加剤の影響] 実施例1

1.5 mlスクリューキャップ式マイクロチューブ(アシスト社製)中で、製造例1にて調製したコムギ胚芽抽出液(タンパク質濃度5.00重量%)100μlに、濃度を12.50重量%に調整したmyo-イノシトールを滅菌蒸留水に溶解した水溶液80μlを添加し、混和してmyo-イノシトール濃度5.50重量%およびタンパク質濃度2.75重量%の混合液を調製した。その混合液を、凍結乾燥機(日本真空乾燥\*

\*装置DF-03H; 日本真空技術株式会社製)中、-35°Cで1時間凍結させ、真空ポンプを用いて1 Torr以下になるよう減圧した。その時マイクロチューブは、チューブの型にくりぬいたアルミブロックに固定し、キャップを緩めておいた。その後、一晩かけて徐々に温度を上昇させ、サンプルの温度と機内の温度が同一になったことを確認後、真空ポンプのスイッチを切った。次いで、窒素ガスを機内に充満させ圧を常圧に戻した後、窒素ガス充満下でマイクロチューブのキャップをきつく閉めて密封した。以上のようにして凍結乾燥された細胞抽出液(コムギ胚芽抽出液)組成物(以下、凍結乾燥組成物と称する)を調製した。

【0045】実施例2および比較例1~7

実施例1と同様にして、表1に示す各凍結乾燥組成物を調製した(比較例7は、添加剤を含有する水溶液の代わりに滅菌蒸留水を使用して調製した)。

【0046】

【表1】

| 添加剤  | 混合液                |              | 凍結乾燥組成物    |              |
|------|--------------------|--------------|------------|--------------|
|      | 最終濃度               |              | 含有量        |              |
|      | 添加剤<br>重量%         | タンパク質<br>重量% | 添加剤<br>重量% | タンパク質<br>重量% |
| 実施例1 | myo-イノシトール<br>5.50 | 2.75         | 64.8       | 32.4         |
| 実施例2 | myo-イノシトール<br>2.75 | 2.75         | 47.9       | 47.9         |
| 比較例1 | トレハロース<br>2.75     | 2.75         | 47.9       | 47.9         |
| 比較例2 | マンニトール<br>2.75     | 2.75         | 47.9       | 47.9         |
| 比較例3 | グルシトール<br>2.75     | 2.75         | 47.9       | 47.9         |
| 比較例4 | キシリトール<br>2.75     | 2.75         | 47.9       | 47.9         |
| 比較例5 | スクロース<br>2.75      | 2.75         | 47.9       | 47.9         |
| 比較例6 | フィコール400<br>2.75   | 2.75         | 47.9       | 47.9         |
| 比較例7 | 無添加                | -            | 2.75       | 92.0         |

【0047】(保存安定性テスト)表1に示す各凍結乾燥組成物を37°Cで24時間保存後、上記バッヂ式活性測定法に従って、各凍結乾燥組成物の無細胞タンパク質合成活性を測定した。その結果を図1に示す。

【0048】図1に示されるように、37°Cで24時間保存した結果、添加剤を含有しない凍結乾燥組成物(比較例7)は、タンパク質合成活性が約20%まで低下したのに對し、myo-イノシトールを含有する凍結乾燥組成物(実施例1および2)は、90%以上の活性を保持していた。

また、従来、安定効果が高いとされていたトレハロースを含有する凍結乾燥組成物(比較例1)は、活性が65%まで低下し、myo-イノシトールと比べるとかなりの活性が失われる事がわかった。また、安定化剤として一般に使用される糖アルコール類では、さらに活性が低く、それらの残存活性率は、マンニトール(比較例2)の場合55%、グルシトール(比較例3)の場合10%、キシリト

ール(比較例4)の場合2.5%であった。また、スクロースを含有する凍結乾燥組成物(比較例5)は、保存安定性は優れているものの、凍結乾燥しない場合においてタンパク質合成活性はその他のものと比べて低く、スクロースはタンパク質合成を阻害することが示唆された。

【0049】[凍結乾燥組成物の保存安定性に及ぼすイノシトールおよびトレハロースの影響の比較]

実施例3および4、ならびに比較例8~10

実施例1と同様にして、表2に示す各凍結乾燥組成物を調製した(比較例8は、添加剤を含有する水溶液の代わりに滅菌蒸留水を使用して調製した)。なお、トレハロースの濃度(10.00重量%:比較例9および5.00重量%:比較例10)は、WO9802532において最も保存安定化効果が確認されている濃度である。

【0050】

【表2】

| 添加剤             | 混合液        |              | 凍結乾燥組成物    |              |
|-----------------|------------|--------------|------------|--------------|
|                 | 最終濃度       |              | 含有量        |              |
|                 | 添加剤<br>重量% | タンパク質<br>重量% | 添加剤<br>重量% | タンパク質<br>重量% |
| 実施例3 myo-イノシトール | 5.50       | 2.75         | 64.8       | 32.4         |
| 実施例4 myo-イノシトール | 2.75       | 2.75         | 47.9       | 47.9         |
| 比較例8 無添加        | -          | 2.75         | -          | 92.0         |
| 比較例9 トレハロース     | 10.00      | 2.75         | 77.0       | 21.2         |
| 比較例10 トレハロース    | 6.00       | 2.75         | 62.6       | 34.4         |

【0051】(保存安定性テスト)表2に示す各凍結乾燥組成物を37°Cで24時間保存後、上記バッチ式活性測定法に従って、各凍結乾燥組成物の無細胞タンパク質合成活性を測定した。その結果を図2に示す。

【0052】図2に示されるように、myo-イノシトールを添加した凍結乾燥組成物(実施例3および4)は、37°Cで24時間保存後も80%以上の活性を保持していたのに対し、トレハロースを添加した凍結乾燥組成物(比較例9および10)は、60%程度まで活性が低下した。従って、細胞抽出液の安定化剤として、トレハロースよりも\*

10\* myo-イノシトールの方がはるかに優れていることが明らかである。

【0053】[凍結乾燥組成物を用いた透析法による連続的無細胞タンパク質合成]

実施例5および比較例11

実施例1と同様にして、表3に示す凍結乾燥組成物を調製した(比較例11は、添加剤を含有する水溶液の代わりに滅菌蒸留水を使用して調製した)。

【0054】

【表3】

| 添加剤             | 混合液        |              | 凍結乾燥組成物    |              |
|-----------------|------------|--------------|------------|--------------|
|                 | 最終濃度       |              | 含有量        |              |
|                 | 添加剤<br>重量% | タンパク質<br>重量% | 添加剤<br>重量% | タンパク質<br>重量% |
| 実施例5 myo-イノシトール | 5.50       | 2.75         | 64.8       | 32.4         |
| 比較例11 無添加       | -          | 2.75         | -          | 92.0         |

【0055】表3に示す各凍結乾燥組成物を用いて連続系における無細胞タンパク質合成を行った。当該連続系における無細胞タンパク質合成は遠藤等の論文(Y. Endo et al., (1992) J. Biotech., 25, 221-230およびK. M. Madin et al., (2000) PNAS, 97(2), 559-564)に従って行った。表3に示す各凍結乾燥組成物を37°Cで24時間保存した後、これらを用いて上記バッチ式活性測定法における反応溶液Aを調製し、当該反応溶液Aをディスボダイアライザー(Bio-Tech透析カップMWC012000; 第一化学薬品株式会社製)に入れ、当該反応溶液Aの10倍容量の透析外液(20mM HEPES-KOH(pH7.6)、95 mM 酪酸カリウム、2.65 mM 酪酸マグネシウム、4 mM ジチオトリアート、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mM クレアチニン酸、0.38 mM スペルミジン、20種類のL-アミノ酸(各0.3 mM)、0.005%(w/v) アジ化ナトリウム)に対して透析を実施した。透析は26°Cにてスターラーで攪拌しつつ実施し、24時間おきに新しい外液と交換した。また、24時間おきに新たに80 μg/mlになるようにmRNAを補給した。タンパク質合成の解析は合成後48時間後の反応液1 μlを分取し、非変性条件下で電気泳動後、クレマシーブリリアントブルーにて染色し検出した。その結果を図3に示す。なお、コントロールとして、同一ロット

のコムギ胚芽抽出液を液体窒素中で保存したものを用いて同様に連続的タンパク質合成を行った。

【0056】図3に示されるように、myo-イノシトールを含有する凍結乾燥組成物(実施例5:レーン6)については、コントロール(レーン4)とほぼ同等のタンパク質が合成されていることがわかった。また、myo-イノシトールを含有しない凍結乾燥組成物(比較例11:レーン5)は、タンパク質は合成されるもののコントロールと比べると明らかに合成量が少なく、細胞抽出液のタンパク質合成活性がかなり低下していることが示唆された。

【0057】[クレアチニン(ホスホ)キナーゼ添加系の保存安定性に及ぼすイノシトールの影響]

実施例6および7

滅菌蒸留水(実施例6)またはクレアチニン(ホスホ)キナーゼ(Cr-K)(Roche製)を滅菌蒸留水に溶解して調製した10 mg/mlのCr-K水溶液(実施例7)を、製造例1のコムギ胚芽抽出液100 μlに対して16.5 μl添加した後、実施例1と同様にして、表4に示す各凍結乾燥組成物(実施例6および7)を調製した。

【0058】

【表4】

| 添加剤              | 混合液        |              |             | 凍結乾燥組成物    |              |             |
|------------------|------------|--------------|-------------|------------|--------------|-------------|
|                  | 最終濃度       |              |             | 含有量        |              |             |
|                  | 添加剤<br>重量% | タンパク質<br>重量% | Cr-K<br>重量% | 添加剤<br>重量% | タンパク質<br>重量% | Cr-K<br>重量% |
| 実施例 6 myo-イノシトール | 2.50       | 2.75         | -           | 45.5       | 50.0         | -           |
| 実施例 7 myo-イノシトール | 2.50       | 2.75         | 0.08        | 44.9       | 49.3         | 1.5         |

【0059】(保存安定性テスト) 表4に示す各凍結乾燥組成物を37°Cで24時間保存後、上記バッチ式活性測定法に従って、各凍結乾燥組成物の無細胞タンパク質合成活性を測定した。その際、Cr-Kを含有するもの(実施例7)については、アッセイ時にCr-Kを添加せずに行った。その結果を図4に示す。

【0060】図4に示されるように、Cr-Kを含有するもの(実施例7)についてもほぼ100%活性が保持されることが明らかとなった。なお、結果は示していないが、Cr-Kを反応液に加えないで無細胞タンパク質合成を行った場合、タンパク質合成活性は1/10以下であった。

【0061】[凍結乾燥組成物における潮解性物質の影響]

実施例8 および比較例12～14

\* 製造例1において酢酸カリウム(KOAc)を含まない最終バッファーを使用してコムギ胚芽抽出液を調製した(KOAc(-)抽出液)。KOAc(-)抽出液を使用すること以外は実施例1と同様にして、表5に示す各凍結乾燥組成物(実施例8ならびに比較例13および14)を調製した(比較例13は、添加剤を含有する水溶液の代わりに滅菌蒸留水を使用して調製した)。また、比較例12は、KOAcを含む最終バッファーを使用して調製したコムギ胚芽抽出液(KOAc(+)抽出液)を使用し、さらに添加剤を含有する水溶液の代わりに滅菌蒸留水を使用して、実施例1と同様にして調製した。

【0062】

【表5】

\*20

| 添加剤              | 混合液        |              |             | 凍結乾燥組成物    |              |             |
|------------------|------------|--------------|-------------|------------|--------------|-------------|
|                  | 最終濃度       |              |             | 含有量        |              |             |
|                  | 添加剤<br>重量% | タンパク質<br>重量% | KOAc<br>重量% | 添加剤<br>重量% | タンパク質<br>重量% | KOAc<br>重量% |
| 実施例 8 myo-イノシトール | 2.75       | 2.75         | 0.0         | 48.8       | 48.8         | 0.0         |
| 比較例 12 無添加       | -          | 2.75         | 0.1         | -          | 92.0         | 3.7         |
| 比較例 13 無添加       | -          | 2.75         | 0.0         | -          | 95.5         | 0.0         |
| 比較例 14 トレハロース    | 2.75       | 2.75         | 0.0         | 48.8       | 48.8         | 0.0         |

【0063】(保存安定性テスト) 表5に示す各凍結乾燥組成物を37°Cで48時間保存した後、上記バッチ式活性測定法に従って、各凍結乾燥組成物の無細胞タンパク質合成活性を測定した。その結果を図5に示す。

【0064】図5に示されるように、KOAcを含有する凍結乾燥組成物(比較例12)はほとんど活性が失われているのに対し、KOAcを含有しない凍結乾燥組成物(比較例13)については約20%活性が残存していた。また、KOAcを含有せず、かつイノシトールを含有する凍結乾燥組成物(実施例8)は、活性が36%も保持されており、テストを行った凍結乾燥組成物のなかでも最高の保存安

定性を示した。

【0065】[凍結乾燥組成物の保存安定性に及ぼす添加剤の相乗効果]

30 実施例9～12、ならびに比較例15および16

上記KOAc(-)抽出液を用いて、実施例1と同様にして、表6に示す各凍結乾燥組成物を調製した(比較例15は、添加剤を含有する水溶液の代わりに滅菌蒸留水を使用して調製した)。

【0066】

【表6】

| 添加剤                          | 混合液        |              | 凍結乾燥組成物    |              |
|------------------------------|------------|--------------|------------|--------------|
|                              | 最終濃度       |              | 含有量        |              |
|                              | 添加剤<br>重量% | タンパク質<br>重量% | 添加剤<br>重量% | タンパク質<br>重量% |
| 実施例9 myo-イノシトール              | 2.75       | 2.75         | 49.0       | 49.0         |
| 実施例10 myo-イノシトール<br>トレハロース   | 各2.75      | 2.75         | 各33.0      | 各33.0        |
| 実施例11 myo-イノシトール<br>マンニトール   | 各2.75      | 2.75         | 各33.0      | 各33.0        |
| 実施例12 myo-イノシトール<br>フィコール400 | 各2.75      | 2.75         | 各33.0      | 各33.0        |
| 比較例15 無添加                    | -          | 2.75         | -          | 95.0         |
| 比較例16 myo-イノシトール<br>グルシトール   | 各2.75      | 2.75         | 各33.0      | 各33.0        |

【0067】(保存安定性テスト)表6に示す各凍結乾燥組成物を37°Cで48時間保存後、上記バッチ式活性測定法に従って、各凍結乾燥組成物の無細胞タンパク質合成活性を測定した。その結果を図6に示す。

【0068】図6に示されるように、myo-イノシトールを単独で含有する凍結乾燥組成物(実施例9)は、20%の残存活性であったのに対し、さらにトレハロースを含有する場合(実施例10)は52%、マンニトールを含有する場合(実施例11)は34%、また、フィコール400を含有する場合(実施例12)は38%と、相乗効果が確認された。一方、myo-イノシトールとグルシトールとを含有する場合(比較例16)、逆にマイナスの効果が確認された。

【0069】[凍結された細胞抽出液(コムギ胚芽抽出液)組成物の保存安定性に及ぼす各多価アルコールの影響]

#### 実施例13～19および比較例17

製造例1の方法で調製したコムギ胚芽抽出液100μlに各添加剤の最終濃度が表7に示す濃度になるように各添加剤を添加し、次いで-15°Cで凍結させることにより各凍結されたコムギ胚芽抽出液組成物(以下、凍結組成物と称する)を調製した。

#### 【0070】

#### 【表7】

| 添加剤              | 混合液        |              |
|------------------|------------|--------------|
|                  | 最終濃度       |              |
|                  | 添加剤<br>重量% | タンパク質<br>重量% |
| 実施例13 myo-イノシトール | 2.75       | 2.75         |
| 実施例14 トレハロース     | 2.75       | 2.75         |
| 実施例15 マンニトール     | 2.75       | 2.75         |
| 実施例16 グルシトール     | 2.75       | 2.75         |
| 実施例17 キシリトール     | 2.75       | 2.75         |
| 実施例18 スクロース      | 2.75       | 2.75         |
| 実施例19 フィコール400   | 2.75       | 2.75         |
| 比較例17 無添加        | -          | 2.75         |

【0071】(保存安定性テスト)各凍結組成物を-15

20 °Cで1週間放置した後、上記バッチ式活性測定法に従って、各凍結組成物の無細胞タンパク質合成活性を測定した。その結果を図7に示す。

【0072】図7に示されるように、多価アルコールを含有しない凍結組成物(比較例17)は、約30%まで活性が低下したのに対し、多価アルコールを含有する凍結組成物(実施例13～19)は55%以上の活性を保持していた。特にイノシトール(実施例13)、グルシトール(実施例16)、キシリトール(実施例17)、フィコール400(実施例19)を含有する凍結組成物は、70%以上もの活性を保持していた。

#### 【0073】

【発明の効果】本発明の無細胞タンパク質合成用の凍結乾燥され得るまたは凍結乾燥された組成物は、安定化剤としてイノシトールを含有することにより、凍結乾燥状態において優れた保存安定性を示す。また、本発明の無細胞タンパク質合成用の凍結され得るまたは凍結された組成物は、安定化剤として多価アルコールを含有することにより、凍結状態において優れた保存安定性を示す。従って、本発明によれば、従来よりも簡便かつ確実に無細胞タンパク質合成用組成物を安定供給することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】凍結乾燥された細胞抽出液(コムギ胚芽抽出液)組成物の保存安定性に及ぼす各添加剤の影響を示す40 図である。コントロール:凍結乾燥せず、液体窒素中サンプルと同一時間保存したもの、凍結乾燥:凍結乾燥後、37°Cで24時間保存したもの。

【図2】凍結乾燥された細胞抽出液(コムギ胚芽抽出液)組成物の保存安定性に及ぼすイノシトールとトレハロースの影響を示す図である。コントロール:凍結乾燥せず、液体窒素中サンプルと同一時間保存したもの、凍結乾燥:凍結乾燥後、37°Cで24時間保存したもの。

【図3】凍結乾燥された細胞抽出液(コムギ胚芽抽出液)組成物を用いた透析法による連続的無細胞タンパク質合成の結果を示す電気泳動図である。

50

(タンパク質合成前)

レーン1:コントロール、レーン2:比較例11、レーン3:実施例5

(タンパク質合成後)

レーン4:コントロール、レーン5:比較例11、レーン6:実施例5

GFP:Green fluorescent protein.

【図4】クレアチニン(ホスホ)キナーゼを含む凍結乾燥された細胞抽出液(コムギ胚芽抽出液)組成物の保存安定性に及ぼすイノシトールの影響を示す図である。コントロール:凍結乾燥せず、液体窒素中サンプルと同一時間保存したもの。

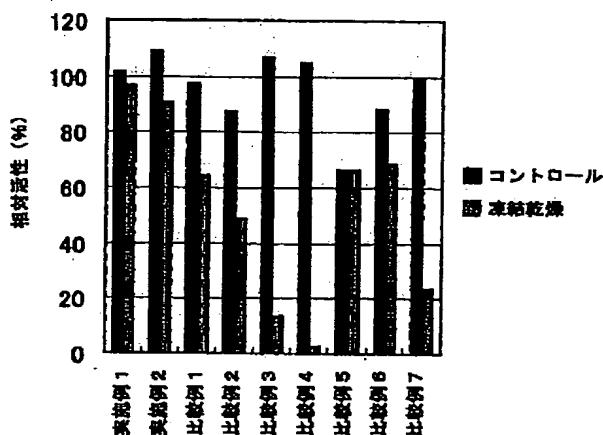
＊【図5】凍結乾燥された細胞抽出液(コムギ胚芽抽出液)組成物の保存安定性に及ぼす潮解性物質の影響を示す図である。

【図6】凍結乾燥された細胞抽出液(コムギ胚芽抽出液)組成物の保存安定性に及ぼす添加剤の相乗効果を示す図である。

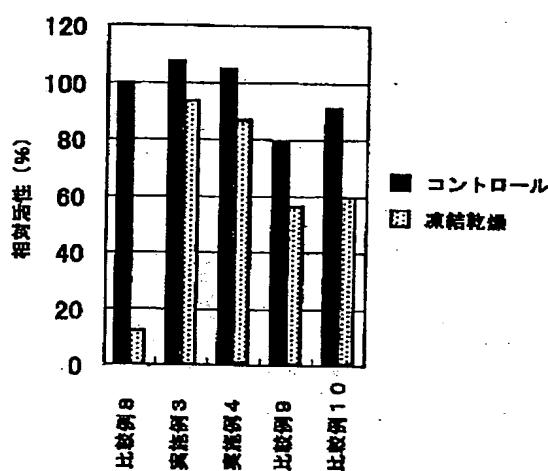
【図7】凍結された細胞抽出液(コムギ胚芽抽出液)組成物の保存安定性に及ぼす各添加剤の影響を示す図である。コントロール:凍結せず、液体窒素中サンプルと同一時間保存したもの、凍結:-15°Cで凍結後、1週間保存したもの。

＊

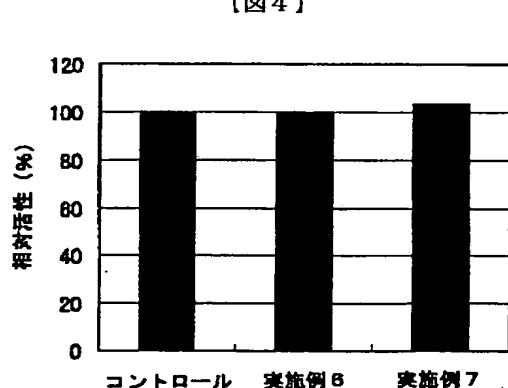
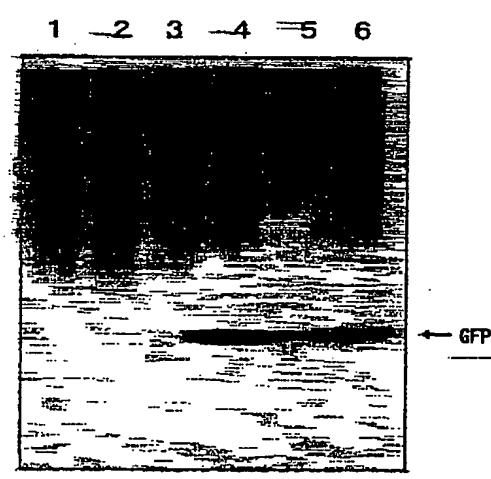
【図1】



【図2】

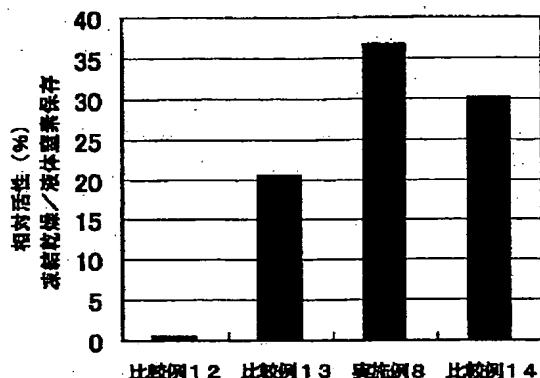


【図3】

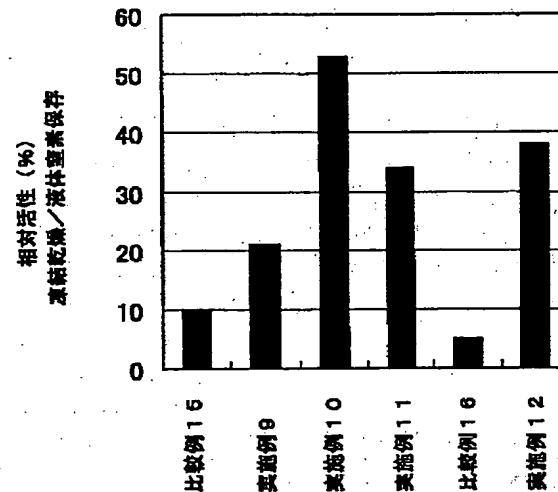


【図4】

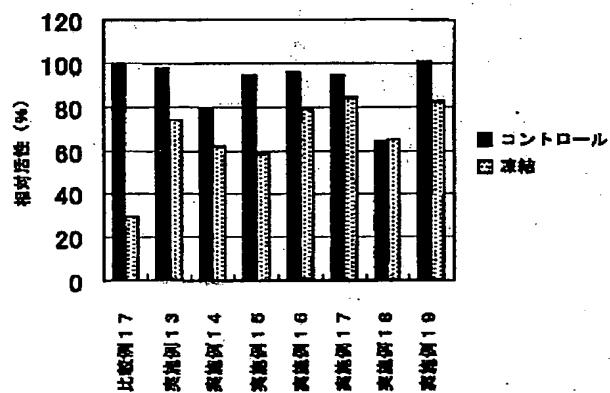
【図5】



【図6】



【図7】



### フロントページの続き

(72)発明者 黒板 敏弘  
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川上 文清  
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川村 良久  
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 西川 茂道  
京都市左京区一乗寺西水干町17番地 和研薬株式会社内

(72)発明者 遠藤 弥重太  
愛媛県松山市久万ノ台478-17

F ターム(参考) 4B064 AG01 CA11 CC24 CD02 CD06  
CD10 CD12 CD13 CD15 CE14  
4B065 AA26Y AA88Y AA90Y AC03  
BD01 BD09 BD10 BD16 BD17  
BD18 BD27 BD29 BD32 BD33  
BD34 BD36 CA24